

Artículo original

Presencia de *Rickettsia* sp en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* parasitando perros domésticos en la isla de Cozumel, Quintana Roo, México

Miguel Cuitun Borges¹, Paola Castellanos Escalante¹, Nínive Carrillo González¹, Mónica Aguayo Romero¹, Lucero Montserrat Balmaceda¹

¹Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. En el estado de Quintana Roo podría existir la presencia de *Rickettsia* circulando entre vectores y hospederos a los que se encuentra expuesta la población, **OBJETIVO.** Determinar la presencia de *Rickettsia* sp. en especies de garrapatas que parasitan perros domésticos en la isla de Cozumel por medio de técnicas de biología molecular, en una clínica veterinaria. **MATERIAL Y MÉTODOS.** Se revisaron 65 perros y se colectaron 188 garrapatas, las cuales se identificaron como *Rhipicephalus sanguineus*; posteriormente fueron procesadas para extraer ADN por un kit comercial, en el que se amplificó por medio de PCR una región de 434pb y 381pb del gen 17 kDa y gltA respectivamente, los cuales son comunes para todas las especies de *Rickettsia*. **RESULTADOS.** Resultaron positivas 26 garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus*. **CONCLUSIONES.** Se establece por primera vez, la presencia de bacterias del género *Rickettsia* circulando en ectoparásitos de perros domésticos en el municipio de Cozumel, Quintana Roo. **Palabras clave:** Rickettsiosis, *Rickettsia*, zoonosis, ectoparásito, vector.

SUMMARY

INTRODUCTION. In the state of Quintana Roo, several *Rickettsia* species could be circulating between vectors and hosts to which it's exposed the population. **OBJECTIVE.** Determine the presence of *Rickettsia* sp. in tick species that parasitizes domestic dogs on the island of Cozumel by means of molecular biology in a veterinary clinic. **METHODS.** In the study, 65 dogs were inspected collecting 188 *Rhipicephalus sanguineus* ticks. Subsequently were processed to extract DNA where was amplified by means of PCR a region of 434pb and 381pb of the gene 17 kDa and gltA, respectively, which are common for all species of *Rickettsia*. **RESULTS.** We identified 26 positive *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **CONCLUSIONS.** We establish for the first time, the presence of bacteria of the genus *Rickettsia* circulating in ectoparasites of domestic dogs in the island of Cozumel, Quintana Roo.

Keywords: Rickettsioses, *Rickettsia*, zoonoses, parasite, vector

Autor de correspondencia: Biol. Lucero Montserrat Balmaceda. Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias I. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Yucatán. Avenida Itáez número 498 entre 59 y 59-A. Centro. CP 97000. Mérida, Yucatán, México. Correo electrónico: bicho.mony@hotmail.com

Fecha de recepción: 11 de junio de 2015

Fecha de aceptación: 12 de diciembre de 2015

Introducción.

La rickettsiosis fue descrita por primera vez en Estados Unidos a principios del siglo pasado y se ha reportado en varios países de América. En México fue descrita en el año de 1910. En los estados de Coahuila, San Luis Potosí, Sinaloa y Sonora, desde 1985 se reporta año tras año la presencia de ésta enfermedad, en Yucatán, Jalisco y toda la zona norte del país se ha demostrado la presencia de anticuerpos en humanos, actualmente es considerada endémica en los estados de Coahuila y Sinaloa, con 30 o 40 casos por año (1).

Se han realizado diversos estudios sobre rickettsiosis en el estado de Yucatán principalmente en pacientes con padecimientos febriles, entre ellos, los trabajos de Zavala-Velázquez y Cols. en 1996 y en 1999, los cuales incluyeron la ciudad de Mérida en donde se encontraron anticuerpos hacia especies de *Rickettsia*. En el año 2006 se dio el primer caso documentado y mortal, el de una niña de 4 años (2,3).

En México, las condiciones de las zonas urbanas y suburbanas favorecen la proximidad de los humanos con los animales silvestres, domésticos o peri domésticos, ya que el hábitat de ambos se encuentra estrechamente relacionado; ratones, ratas, zarigüeyas, coyotes, perros, gatos y mapaches, entre otros, a menudo habitan en patios y casas (4). Debido a que el ciclo de transmisión involucra a mamíferos y vectores (pulgas, piojos y garrapatas), el contacto con los hospederos, juega un papel relevante en el ciclo de transmisión a los humanos (5, 6).

Debido a que las características climatológicas, epidemiológicas, socioeconómicas y culturales se comparten en diferentes estados de la península, en el estado de Quintana Roo podría existir la presencia de *Rickettsia*, sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios en éste estado, razón por la cual la rickettsiosis puede estar siendo sub diagnosticada o ignorada por parte de la comunidad médica y

científica debido a la falta de conocimiento acerca de ésta enfermedad, , lo cual explica su tardanza y mal manejo en cuanto a diagnóstico y tratamiento (7), de encontrarse, los médicos tendrían razón para incluir una prueba de diagnóstico diferencial, ante los primeros síntomas, con lo cual se esperaría una mejora considerable en el tratamiento y control epidemiológico y se podrían disminuir los índices de mortalidad asociados a la falta de un diagnóstico oportuno y por consiguiente, un tratamiento adecuado (8).

Este estudio tiene como objetivo identificar la presencia de *Rickettsia* en vectores ectoparásitos (garrapatas) obtenidos de perros domésticos, del municipio de Cozumel, Quintana Roo, a fin de aportar datos epidemiológicos útiles para poder incluir este padecimiento dentro de los diagnósticos diferenciales de enfermedades febriles transmitidas por ectoparásitos. La importancia del estudio de la rickettsiosis en el estado de Quintana Roo, específicamente en la Isla de Cozumel, recae en la posibilidad de dicha isla, de actuar como un sitio de importación y exportación de enfermedades transmitidas por garrapatas, como la rickettsiosis, que afectan a la población humana.

Materiales y Métodos.

El estudio realizado fue de tipo observacional, descriptivo y transversal, realizado durante los meses de febrero, marzo y abril del año 2015 en la clínica veterinaria "Palancapia" en Cozumel, Quintana Roo. Con previa solicitud de consentimiento informado, se solicitó ayuda de los dueños y el personal veterinario para sujetar a las mascotas a fin de que los perros estuvieran lo más relajados y cómodos posible para proceder a la revisión y recolección de garrapatas, las cuales fueron colectadas de manera manual para evitar causar daños a los perros. Los ectoparásitos obtenidos fueron almacenados en frascos de

plástico y después colocados a -20°C hasta su transporte al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias I de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Yucatán para su clasificación taxonómica y análisis.

Las garrapatas fueron procesadas individualmente y preparadas previamente para la extracción y purificación de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) mediante lavados con etanol absoluto y agua destilada, posteriormente se realizó la extracción de ADN siguiendo el protocolo del estuche comercial "DNA tissue kit" de la marca Qiagen. Las muestras de ADN purificadas fueron cuantificadas en un espectrofotómetro "SmartSpec™ Plus" de la marca Bio-Rad.

La identificación de ADN rickettsial se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR) amplificando dos regiones de genes conservados únicos para bacterias del género *Rickettsia*: *17 kDa* y *gltA* (4). Cada muestra se preparó adicionando 150 ng de ADN purificado; $0.3\mu\text{l}$ de Platinum® Taq DNA Polimerasa (Invitrogen), $5\mu\text{l}$ de 10x PCR Buffer para obtener una concentración final de 1x, $1.5\mu\text{l}$ de MgCl_2 50 mM, $1\mu\text{l}$ de nucleótidos 10 mM y $0.5\mu\text{l}$ de cada primer, se completó con agua estéril hasta un volumen final de $50\mu\text{l}$. Para el gen de *17 kDa* que amplifica una región de aproximadamente 434 pb, se emplearon los primers Fw1: 5'-GCTCTGCAACTTCTATGTT-3' y Rv2: 5'-CATTGTCGTCAGGTTGGCG-3', mientras que para el gen *gltA* los primers RpCS.877p: 5'-GGGGCCTGCTCACGGCGG-3' y RpCS.1258n: 5'ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA -3' amplifican una región de 381 pb. La reacción para el fragmento del gen de *17 kDa* se realizó con las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C durante 3 minutos; 35 ciclos a 94°C por 1 minuto para la desnaturalización, 48°C por 5 minutos para el alineamiento y 72°C por 2 minutos para la extensión;

seguidos de un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos. Para el gen *gltA*, las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C durante 1 minuto; 35 ciclos a 95°C por 20 segundos para la desnaturalización, 49°C por 30 segundos para el alineamiento y 60°C por 2 minutos para la extensión; seguidos de un ciclo de extensión final a 60°C durante 7 minutos. Ambas condiciones se realizaron en un termociclador Multigene Gradient de la marca Labnet International, Inc. Posteriormente se tomaron $10\mu\text{l}$ de cada producto amplificado y fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5x en TAE (Tris-Acetato-EDTA) al 1%. El gel obtenido fue teñido con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 mg/ml y se observó sobre un transluminador de luz ultravioleta comparando las bandas obtenidas con el marcador de peso molecular de 1kb DNA ladder (Biolabs).

Resultados.

Se inspeccionaron un total de 65 perros domésticos colectándose 188 garrapatas, las cuales pertenecieron a la especie *Rhipicephalus sanguineus*. El análisis por PCR de punto final para la detección de bacterias del género *Rickettsia* reportó 26 garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* positivas de 188 analizadas, es decir, 13.8 %. Se consideró como positiva, toda muestra que fuera positiva en ambas pruebas. El número de perros de los cuales se obtuvieron garrapatas positivas a bacterias del género *Rickettsia* fue de 18 (27%).

Discusión.

En el estudio, se reporta por vez primera, la presencia de bacterias del género *Rickettsia* en garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* en el municipio e Isla de Cozumel, Quintana Roo. *Rhipicephalus sanguineus* es la especie de garrapata que se encuentra comúnmente parasitando perros en todo el mundo (9). La incidencia de la Rickettsiosis ha venido aumentando en los

últimos años, las causas de éste aumento parecen estar relacionadas con una mayor presencia de los vectores así como un mayor acercamiento del hombre a los mismos debido a condiciones insalubres e inclusive por desconocimiento del papel transmisor de enfermedades que tienen diversos vectores ectoparásitos como las garrapatas o las pulgas. Inclusive, la existencia de factores sociales y culturales pone en riesgo a la población. Estudios realizados en otros países y estados, como Baja California, Brasil o Estados Unidos (10 – 12), reportan la presencia de *Rickettsia rickettsii* en *Rhipicephalus sanguineus* por lo que, posiblemente, esta sea la especie de *Rickettsia* encontrada, sin embargo, es necesario realizar estudios posteriores de caracterización y análisis filogenéticos para determinar la especie de *Rickettsia* encontrada. La inspección de los perros analizados en la búsqueda de ectoparásitos, no reportó la presencia de otros artrópodos como pulgas, sin embargo, no se pudo descartar su presencia en la zona de estudio ni su posible papel como vectores de algunas especies de *Rickettsia*.

En Yucatán, la gran mayoría de las viviendas presentan características como cercanía con terrenos deshabitados, convivencia con animales domésticos y peri domésticos, patios compartidos, entre otros. Todas estas características se consideran como factores de riesgo para adquirir una zoonosis, debido a esto existen diversos estudios sobre la relación de los factores de riesgo con la presencia de ciertas enfermedades, entre ellas la Rickettsiosis, en comunidades donde éstas características son muy evidentes y están, a su vez, interactuando con factores culturales, económicos y sociales. Estas comunidades se consideran con bajo índice de desarrollo humano, donde la pobreza y las malas condiciones higiénicas están presentes, frecuentemente tienen un alto grado de marginación, así como viviendas sin servicios sanitarios y un nivel de hacinamiento elevado. La presencia de estas

condiciones representa un riesgo importante para los habitantes ya que promueven el contacto y/o exposición frecuente con vectores ya sea por convivencia con animales domésticos y peri domésticos o por exposición accidental con animales silvestres, aumentando la posibilidad de adquirir una enfermedad debido a una picadura o por exposición directa a las heces de los vectores.

La rickettsiosis no es considerada como parte del diagnóstico diferencial al evaluar pacientes con una enfermedad febril, lo cual se debe en parte al desconocimiento por parte de la población y los trabajadores de la salud, sobre la frecuencia y distribución tanto de posibles vectores como de hospederos, a la poca frecuencia de casos documentados, ya que muchas ocasiones el parecido del cuadro clínico con otros padecimientos febriles a los que se les otorga mayor relevancia epidemiológica conlleva a un mal diagnóstico. La similitud de las infecciones por *Rickettsia* y otras enfermedades endémicas de Yucatán, tales como el dengue, la *Leptospira* y la mononucleosis infecciosa (13), y la continua exposición ambiental de los habitantes rurales a los vectores hace necesario implementar un programa de vigilancia epidemiológica en Quintana Roo ya que la población de éste Estado, tanto residente como visitante, se encuentra posiblemente en riesgo de adquirir la enfermedad dado que la mayoría de la población se dedica a laborar en zonas turísticas donde el contacto con la naturaleza es directo y donde también el turista puede ser parasitado por un artrópodo infectado por especies de *Rickettsia*.

Es necesario realizar estudios para determinar la ecología, el ciclo de vida y la distribución geográfica de posibles vectores en la isla de Cozumel, Quintana Roo así como también para determinar cuál o cuáles son las especies de *Rickettsia* que se encuentran circulando en ésta zona. Se deben realizar esfuerzos para evitar el sub diagnóstico de

esta patología y que sea considerada dentro de las posibles causas de enfermedades febriles no específicas. De igual manera, se deben desarrollar programas para informar y generar estrategias para el control de vectores y trabajar en comunidades con escasos conocimientos sobre las enfermedades transmitidas por ectoparásitos a fin de sensibilizar a la población y disminuir el riesgo de adquirir una rickettsiosis.

Bibliografía.

1. Mercado-Uribe M. Rickettsiosis. Historia y actualidades. *Enf Inf Microbiol* 2010; 30 (1): 25-31.
2. Zavala-Velázquez JE, Ruiz-Sosa J, Vado-Solís I, Billings AN, Walker DH. Serologic study of the prevalence of rickettsiosis in Yucatán: evidence for a prevalent spotted fever group rickettsiosis. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 61(3): 405-08.
3. Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez JE, Walker DH, Ruiz Arcila EE, Laviada-Molina H, Olano JP, et al. Fatal Human Infection with *Rickettsia rickettsii*, Yucatán, Mexico. *Emerg Infec Dis*. 2006; 12(4): 672-74.
4. Oteo J, Nava S, de Sousa R, Mattar S, Venzal J, Abarca K, Labruna M, Zavala-Castro J. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Rev Chilena Infectol*. 2014; 31(1):54-65.
5. Peniche G, Dzul K, Jiménez B, Vado I, Pérez C, Zavala J. Identificación de *Rickettsia* spp. en garrapatas *Amblyomma cajennense* parasitando bovinos en ranchos del estado de Yucatán. *Cien y Hum en la Sal*. 2014; 1(1): 23 – 27.
6. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica: Rickettsiosis, una enfermedad presente pero olvidada. *Rev Vig Epid*. 2010, Nov; 27 (46): 1 – 4.
7. Reyes E, Ruíz H, Escobedo J, Rodríguez I, Bolio M, Polanco A, et al. Situación actual y perspectivas para el estudio de enfermedades zoonóticas emergentes, re-emergentes y olvidadas en la península de Yucatán. *Trop & Subtrop Agro*. 2011, Ene – Abr; 14 (1): 35 – 54.
8. Field J, Seijo J. Rickettsiosis en Baja California. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son*; 2011, 28 (2): 44 – 50.
9. Dantas-Torres. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & vectors*. 2010; 3(26):1-11.
10. Field-Cortazares J, Escárcega-Ávila AM, López-Valencia G, Barreras-Serrano A, Tinoco-Gracia L. Seroprevalence of risk factors associated with rickettsiosis (*Rickettsia rickettsii*) in humans in Baja California, Mexico. *Gac Med Mex*. 2015;151(1):42-6.
11. Melo AL, Witter R, Martins TF, Pacheco TA, Alves AS, Chitarra CS, Dutra V, Nakazato L, Pacheco RC, Labruna MB, Aguiar DM. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. *Med Vet Entomol*. 2015. doi: 10.1111/mve.12139.
12. Drexler NA, Dahlgren FS, Heitman KN, Massung RF, Paddock CD, Behravesh CB. National Surveillance of Spotted Fever Group Rickettsioses in the United States, 2008-2012. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;pii:15-0472.
13. Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez JE, Peniche – Lara GF, Sulú Uicab JE. Human rickettsialpox, southeastern México. *Emerg Infec Dis* 2009 15(10).